

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 2003-339373

(43)Date of publication of application : 02.12.2003

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

C12M 1/24

C12M 1/40

C12M 1/42

C12M 3/00

C12N 1/02

(21)Application number : 2002-150623

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF  
ADVANCED INDUSTRIAL &  
TECHNOLOGY

(22)Date of filing : 24.05.2002

(72)Inventor : SUMARU KIMIO  
KAMEDA MITSUYOSHI  
KANAMORI TOSHIYUKI  
SHINPO TOSHIO**(54) FRACTIONATION METHOD FOR CELL****(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a means for the culture and fractional recovery of an anchorage dependent cell without damaging the cell while keeping the specific functions of individual organs of the cell with a simple operation.

**SOLUTION:** A light-responding material varying its physical properties by light irradiation is used as an adhesive surface of the anchorage dependent cell and light is radiated to the position of the cell on the adhesive surface to selectively release exclusively the cell of the position while keeping the extracellular matrix and a membrane protein.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-339373

(P2003-339373A)

(43) 公開日 平成15年12月2日 (2003. 12. 2)

(51) Int. CL.	識別番号	F I	ページコード (参考)
C 1 2 N	5/06	C 1 2 M 1/24	4 B 0 2 9
C 1 2 M	1/24	1/40	Z 4 B 0 6 0
	1/40	1/42	
	1/42	3/00	A
	3/00	C 1 2 N 1/02	

審査請求 有 請求項の数10 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-150623(P2002-150623)	(71) 出願人	301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区蔵が関1-3-1
(22) 出願日	平成14年5月24日 (2002. 5. 24)	(72) 発明者	須丸 公雄 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	亀田 光敏 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	金森 敏幸 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の分別法

(57) 【要約】

【課題】足場依存性細胞の培養及び分別回収を、細胞に対するダメージを与えることなく、細胞の各器官の特異的機能維持したまま、しかも簡便な操作で行いうる手段を提供する。

【解決手段】 光照射により物性が変化する光応答性材料を足場依存性細胞の接着性表面として用い、該細胞接着性表面の細胞の位置に光を照射することにより、該位置の細胞のみを選択的にしかも細胞外マトリクスや膜タンパク質を保持したまま、剥離させて分別回収する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 光照射によってその物性が変化する光応答性材料からなることを特徴とする細胞接着性表面の形成用材料。

【請求項2】 物性変化が可逆的であることを特徴とする請求項1に記載の材料。

【請求項3】 物性変化が少なくとも細胞の接着性の低下を含むことを特徴とする請求項1又は2のいずれかに記載の材料。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の細胞接着性表面を有することを特徴とする細胞培養装置。

【請求項5】 細胞培養装置がキュベットの形態であることを特徴とする請求項4に記載の装置。

【請求項6】 請求項4または5に記載の細胞培養装置の細胞接着性表面に光照射することにより、細胞接着性表面に接着した細胞を該表面から剥離させ、回収することを特徴とする細胞の回収方法。

【請求項7】 請求項4または5に記載の細胞培養装置の細胞接着性表面に光を照射し、細胞を該表面から剥離させるに際し、光照射領域を選択することにより、該光照射領域に位置する細胞のみを細胞接着性表面から剥離させ、細胞を分別することを特徴とする細胞の分別方法。

【請求項8】 細胞を細胞接着性表面から剥離する際、さらに物理的剥離手段及び/または溶解液を用いることを特徴とする請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】 光照射により細胞との接着性が変化する細胞接着性表面を有する細胞培養キュベット、該キュベットに培養液を供給する手段、該キュベットの細胞接着性表面の任意の位置に光を照射する手段、該細胞接着性表面上の細胞の位置を検出する手段、及び光照射により細胞接着性表面から剥離された細胞を分別する手段を設けたことを特徴とする細胞の培養及び分別装置。

【請求項10】 細胞培養キュベットに、物理的剥離手段及び/または溶解液を供給する手段がさらに設けられていることを特徴とする、請求項9に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、光照射によって細胞との接着性が変化する細胞接着性表面の形成用材料、該細胞接着性表面を有する細胞培養装置、該装置を使用した細胞の培養・分別方法及び細胞の培養・分別装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来の細胞分別技術としては、フローサイトメトリー (FACS) や磁気細胞分離システム (MACS) があり、これらは既に実用化されている。一方、培養された足場依存性細胞の回収に関する従来技術としては、細胞接着物質や膜タンパクを分解せず、その器官特異的機能を維持したまま細胞をシート状態で剥離・回収する手法が報告されている (A.Kikuchi, M.Okuyama, F.Kari-

kusa, Y.Sakurai and T.Okano, J. Biomater. Sci., Polym. Edn., 9, 1331 (1998))。一方、電子線リソグラフィ等の微細加工の手法を用いて、培養容器に接着基質をパターンニングして、生理活性物質や人工化合物を接着基質に導入し、細胞の接着条件と生理活性への影響を解析した例も報告されている (伊藤嘉浩, タンパク質 核酸 酵素, 45, 727 (2000))。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 フローサイトメトリーあるいは磁気細胞分離システムは、白血球あるいはリンパ球等の浮遊細胞の分別回収によく用いられているものであって、これら手段を足場依存性細胞の分別回収に適用する場合においては、基質に接着した足場依存性細胞を浮遊状態にする必要があり、この際、トリプシン等の酵素処理によって細胞接着物質とともに細胞機能を担う膜タンパクも分解される点や、回収細胞を利用する際の問題となっていた。特に、フローサイトメトリーでは、細胞を超音波ノズルで物理的に分離するプロセスにおいて、細胞の受けるダメージが相当に大きい。一方、培養した足場依存性細胞をシート状態で剥離・回収する技術では、温度変化によって接着制御を行うため、培養容器中の種々の細胞あるいは細胞群のうちから、特定の細胞あるいは細胞群 (コロニー) のみを回収しようとする場合において、個々の細胞あるいは細胞群毎にその脱着を制御することは極めて困難であった。そのため、培養された足場依存性細胞を分別回収する技術として、細胞の精密分離と分離された細胞の器官特異的機能の維持を両立させるものはこれまで実現されていなかった。また、上記接着基質のパターンニングに関する例においては、細胞の接着性に变化が見られているが、これは生理活性物質等の導入によるもので、これらの物質の使用なしに細胞の接着性を自在に制御することはできなかった。そこで、本発明の課題は、特に足場依存性細胞の培養及び分別回収を、細胞に対するダメージを与えずに、細胞の各器官の特異的機能維持したまま、しかも簡便な操作を行う手段を提供しようとするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意研究を重ねた結果、光照射により物性が変化する光応答性材料を足場依存性細胞の接着性表面として用いることにより、細胞の器官特異的機能を維持したまま、細胞あるいは細胞群の単位で培養細胞の脱着を容易に制御しうることを見だし、本発明をなすに至った。

【0005】 すなわち、本発明の上記課題の解決手段は以下の(1)～(10)からなるものである。

(1) 光照射によってその物性が変化する光応答性材料からなることを特徴とする細胞接着性表面の形成用材料。

(2) 物性変化が可逆的であることを特徴とする上記

(1)に記載の材料。

(3)物性変化が少なくとも細胞の接着性の低下を含むことを特徴とする上記(1)又は(2)のいずれかに記載の材料。

(5)上記(1)～(3)のいずれかに記載の細胞接着性表面を有することを特徴とする細胞培養装置。

(5)細胞培養装置がキュベットの形態であることを特徴とする上記(4)に記載の装置。

(6)上記(4)または(5)に記載の細胞培養装置の細胞接着性表面に光照射することにより、細胞接着性表面に接着した細胞を該表面から剥離させ、回収することを特徴とする細胞の回収方法。

(7)上記(4)または(5)に記載の細胞培養装置の細胞接着性表面に光を照射し、細胞を該表面から剥離させるに際し、光照射領域を直拭することにより、該光照射領域に位置する細胞のみを細胞接着性表面から剥離させ、細胞を分別することを特徴とする細胞の分別方法。

(8)細胞を細胞接着性表面から剥離する際、さらに物理的刺激手段及び/または溶解液を用いることを特徴とする上記(6)または(7)に記載の方法。

(9)光照射により細胞との接着性が変化する細胞接着性表面を有する細胞培養キュベット、該キュベットに培養液を供給する手段、該キュベットの細胞接着性表面の任意の位置に光を照射する手段、該細胞接着性表面上の細胞の位置を検出する手段、及び光照射により細胞接着性表面から剥離された細胞を分別する手段を設けたことを特徴とする細胞の培養及び分別装置。

(10)細胞培養キュベットに、物理的刺激手段及び/または溶解液を供給する手段がさらに設けられていることを特徴とする、上記(9)に記載の装置。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の細胞接着性表面とは、上記足場依存性細胞増殖の足場となる、細胞が接着する表面を意味する。該表面の形成材料は、光照射によりその物性が変化する光応答性材料からなり、光照射により細胞に対する接着性が変化するものである。該細胞接着性表面の形成材料としては、例えばa)光エネルギーを熱に転換し、その結果もたらされる局所的な温度上昇によって表面の特性を変化させるもの、b)光照射により、表面の酸化状態が変化するもの、あるいはc)光照射により構造が異性化し、その分極率、親水-疎水性が変化するもの等が挙げられ、これらの物性変化は可逆的であることが好ましい。さらに具体的には、上記a)に属する細胞接着性表面の形成用材料とは、例えば、光を熱に変換する色素分子や顔料(色素や顔料は一般的に光を熱に変換する性質を有する)、温度変化によって親水-疎水性が変化するポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)やポリビニルエーテル等の感温性ポリマー等に結合せしめたもの等が挙げられる。この場合、培養装置の基材表面で重合する方法が適用できる。上記b)に属する

細胞接着性表面の形成用材料としては、例えば酸化チタン等の光触媒材料が挙げられ、これらは、例えば溶媒法等により、培養装置の基材表面に光触媒層を形成する。上記c)に属する細胞接着性表面の形成用材料としては、アゾベンゼン、ジアルールエテン、スピロピラン、スピロオキサジン、フルギド、ロイコ色素といった有機化合物の誘導体等の光応答性分子自体、これら光応答性分子自体を結合したモノマー、およびこれらモノマーを重合せしめたポリマー等が挙げられる。上記光応答性分子自体を使用する場合には、これら光応答性分子を、培養装置の基材表面に例えばシランカップリング剤等を用いて化学的に、あるいは疎水性相互作用等を利用して物理的に結合させる。上記モノマーを用いる場合には、培養装置の基材表面で重合する方法が適用できる。また、上記ポリマーを使用する場合には、該ポリマーを適当な溶剤に溶解し、培養装置の基材表面に塗布すればよい。

【0007】本発明の上記した光応答性材料から形成される細胞接着性表面は、光照射により、細胞を剥離する機能を有するが、そうでなくとも表面の接着性が低下しており、タンパク質分解酵素の希薄溶液や塩溶液等の溶解液の添加あるいは振動等の物理的刺激により、簡単に細胞を剥離することができる。また、本発明によれば、特に、トリプシン等の酵素を全く、あるいは十分量使用しないため、細胞接着物質であり、細胞機能の発現や保持に重要な働きをするECM(細胞外マトリックス)や膜タンパク質を伴ったまま剥離可能である点が極めて重要な利点である。本発明における培養装置としては、培養ディッシュ、細胞培養キュベット等が挙げられ、上記光応答性材料からなる細胞接着性表面は、これら細胞培養装置の細胞収容側の基材表面に形成される。

【0008】これらの培養装置を用いた細胞の培養、分別方法について図面に基づき以下説明する。第1図は、本発明における細胞の培養、分別方法の概略を示す工程図である。本発明においては、上記細胞培養装置に培養液を入れ、例えば、異なる細胞を含有する試料を播種・培養・増殖させる(1、2)。細胞は上記細胞培養装置の光応答性材料からなる細胞接着性表面に接着し、これを足場として増殖する。これに、例えば、蛍光色素等で標識した各細胞に対するポリクローナル又はモノクローナル抗体を加え、細胞と結合させる。この際、抗体は一つの細胞に対応するものであってもいいし、各細胞に対応する複数種の抗体を用い、各抗体に標識する蛍光色素をそれぞれ異なるように用いてもいい。これにより、分別しようとする細胞あるいはコロニーの位置情報が検出可能となる(3)。この後細胞培養装置内の分別しようとする細胞あるいはコロニーを顕微鏡あるいはカラーCCDカメラ等により検出し、該位置情報を入力コン(PC)に取り込み(4)。この位置情報に基づいて、目的とする細胞あるいはコロニーの位置に光照射する。この光照射により、細胞あるいはコロニーが位置する細胞接着性表

面は変質し、接着性が低下し、上記細胞接着性表面から、目的とする細胞あるいはコロニーのみを分別して剥離させ、これを回収することが可能となる(5)。

【0009】第2図は、複数種の細胞をその種類毎に分別回収する場合の工程概略図である。複数種の細胞をその種類毎に分別回収するには、例えば、各細胞に対応させて、各々異なる蛍光色素等を用いた複数の抗体を用いて、上記細胞接着製表面上の各細胞に結合させ

(1)、蛍光色素の蛍光の相違に基づき各細胞の種類毎にその位置情報を得た後、特定の蛍光を発する細胞の位置に局所的照射を行い、その位置にある細胞あるいはコロニーを剥離させ回収する(2)。次いで照射の領域を変え、次に回収する細胞あるいはコロニーの位置する位置に照射し、上記とは別の種類の細胞を剥離回収する(3)。この工程を順次行うことにより、細胞の種類毎に分別して回収することが可能となる。上記説明では、異なる細胞を各々分別する場合を示したが、本発明においては、特にこれに限定されない。例えば、照射を細胞接着表面全域に照射して、細胞接着製表面に接着した全ての細胞を剥離して回収することもできる。この方法は、単一の細胞を大量に培養回収しようとする場合に有効である。

【0010】また、本発明においては、上記のように蛍光標識抗体を用いる手法のみでなく、種々の蛍光標識法を採用できる。これには、例えば、ルシフェラーゼ等の発光系を構成する酵素の遺伝子を細胞に導入する方法等が挙げられる。さらに、例えば、形態の違う細胞の分別においては、特に蛍光標識を行わなくとも顕微鏡観察下、照射して、目的とする細胞のみを分別して回収することができる。

【0011】次に、上記培養、分別方法の応用例を第3図に基づき説明する。第3図中(1)は、特定の細胞のみを純粋培養する場合の工程概略図である。特定の細胞のみを純粋に培養するには、例えば、上記培養ディッシュに本発明の細胞接着性表面を形成し、特定の細胞を培養する(1)。培養途中他の細胞が混入してきた場合には、逐次該混入細胞の位置する位置に照射して、該細胞を剥離除去して(2)、特定の細胞のみを細胞接着表面上に残し培養を続ける(3)。混入細胞の識別は、上記純粋培養しようとする特定細胞を蛍光標識することにより、蛍光標識されていない混入細胞とを識別することができる。また、上記したように形態上区別する場合においては、特に蛍光標識をしなくとも上記顕微鏡下の観察下、照射により、混入細胞を剥離除去できる。

【0012】第3図中(11)は、細胞のパターニングと複数種の細胞をパターンニングして共培養する場合の工程概略図である。細胞のパターニングは、例えば、ある細胞を細胞接着性表面上に広がるまで培養増殖させ

(1)、計画されたパターンに基づき、該パターンにおいて残すべき細胞区画以外の領域に光を照射し、この領

域に位置する細胞を剥離除去する。残存する細胞は、上記計画されたパターンを形成する(2)。さらに、この細胞が剥離除去された位置に他の細胞を播種させ、共培養すれば、複数種の細胞が区別されパターンニングされることになる(3)。一方、これらのパターンニングにおいて、所定の領域に対して定期的に光を照射しながら細胞培養を行うことによっても、その領域への細胞の接着が阻害されるので、培養細胞の自由なレイトアウトも可能となる。これらの方法は、例えば、細胞の情報伝達を解析したり、複数種の細胞の共存下で産生される生理活性物質を細胞を用いて生産したりする際に、有効な方法である。

【0013】一方、本発明の細胞の培養及び分別装置は、照射により細胞との接着性が変化する細胞接着性表面を有する細胞培養キュベット、該キュベットに培養液を供給する手段、該キュベットの細胞接着性表面の任意の位置に光を照射する手段、該細胞接着性表面の細胞の位置を検出する手段、及び照射により細胞接着性表面から剥離された細胞を分別する手段を有し、さらに必要に応じて溶融液供給手段が付加されて構成されているものである。本発明の細胞の培養及び分別装置について、第4、5図に基づき、さらに具体的に説明する。第4図は、本発明の細胞の培養及び分別装置の1例を示す全体構成図であり、第5図は該装置の細胞培養キュベットにおける細胞の選択剥離の態様を示す要部図である。

【0014】該装置は、細胞接着表面(8)を有する細胞培養キュベット(1)、該キュベットに培養液を供給する培地リザーバ(2)、該キュベットの細胞接着性表面の任意の位置に光を照射する微小2次元パターン照射光学系としてのプロジェクト手段(3)、該細胞接着性表面の細胞の位置を検出し、該位置情報信号を制御部に送出するカラーCCDカメラ(4)、及び光照射により細胞接着性表面から剥離された細胞を分別するためのものであって、回収容器が切り替え可能に設けられた分別回収手段(5)、培地リザーバ(2)と細胞培養キュベット(1)を接続する管路及び細胞培養キュベットと分別回収手段(5)を接続する管路の各々に設けられた開閉手段(6)、(6')、およびこれら各手段全体の動作を制御する制御手段(7)から構成されるが、さらに、必要に応じて細胞培養キュベット(1)に溶融液を供給するための溶融液供給手段(図示せず)設けられているもよい。

【0015】該装置の動作について説明すると、まず、開閉手段6の開閉により、培地リザーバ(2)から細胞培養キュベット(1)に培養液を一定量供給し、細胞を播種し培養する。この際、目的とする細胞(10)は予め蛍光標識されているかあるいは培養後蛍光抗体を用いて標識してもよい。細胞培養キュベット(1)は、その基板(9)上に光透過性材料からなる細胞接着性表面が形成されており、該細胞接着性表面上細胞の位置はカラ

ーCCDカメラ(4)で検出し、その位置情報信号は制御部(7)に入力され、これにより蛍光標識により分別する目的細胞(10)を識別し、該目的細胞(10)が存在する位置に、プロジェクト手段の光照射位置を合わせ光照射する。光照射位置の制御は、制御部による自動制御、あるいはモニタ画面を見ながら手動操作により行う。この操作信号は、プロジェクト手段(3)の光照射位置合わせ手段(3')を起動させて、目的とする細胞(10)の位置に光照射の標準を合わせる。光照射により細胞接着表面は局所的に変質して目的細胞(10)の接着性が低下し、細胞(10)のみ剥離し、培養液中を浮遊する。仮に剥離しなくとも細胞接着性表面の接着性は低下しており、溶離液供給手段からの開閉手段を開くことにより、培養キュベット(1)に溶離液を供給することにより細胞(10)は選択的に剥離される。また、溶離液供給手段に代え、振動等の物理的的刺激手段を併用してもよい。これらの手段により剥離された細胞はECM(細胞外マトリクス)や膜タンパク質を保持している。ついで、開閉手段6、6'を開き、培地リザーバ(2)から培養液を細胞培養キュベットに供給し、剥離した細胞(10)を、分別回収手段5の回収容器5'中に回収する。この操作を繰り返して、細胞(11)及び(12)を順次分別回収する。

【0016】本発明の細胞の培養及び分別装置の各構成部材として、上記細胞培養キュベットは、細胞接着性表面を外部から光照射することができ、該表面上に接着した細胞をモニタできる構造のものを使用する。一方、微小2次元パターン照射光学系としては、個々の細胞あるいは細胞群の空間スケールで、細胞培養キュベットの光応答性材料からなる細胞接着性表面上の任意の領域を照射できるものを用いる。モニタとしては、個々の細胞あるいは細胞群を識別するに十分な解像度、光学倍率、感度を備えるものを使用することが好ましい。また、細胞種を識別するため、複数の抗体担持蛍光色素を用いる場合には、色を識別できることが望ましい。制御系は、モニタによる培養細胞の位置情報の取り込み、それに基づく微小2次元パターン照射光学系からの光照射、剥離細胞回収のためのキュベットへの培地の送出を制御するものを用いることが望ましい。以上においては、主に細胞培養キュベット等の培養装置中で細胞を摘採・培養・増殖を通じたプロセスについて説明したが、本発明においては、単にキュベットに導入し接着させ、これを分別回

収するというプロセスにも適用できる。このプロセスは、例えば複数種の細胞を含む組織等において、各細胞種毎に分離するために有効である。

#### 【0017】

【実施例】光照射による構造の異性化に伴い吸収スペクトルが変化するジアリールエテン誘導体 *cis*-1,2-Dicyano-1,2-bis(2,4,5-trimethyl-3-thienyl) ethane を、スピコンコート法によってガラス基板上に均一に塗布し、光応答性表面を得た。これを、微小2次元パターン照射光学系、モニタおよびこれらを制御する制御系で構成されるシステムに実装し、400-440nmの波長域の青色光(強度 180mW/cm<sup>2</sup>)および500-600nmの波長域の黄色光(強度 160mW/cm<sup>2</sup>)を用いて、光応答性表面の特性を光照射で可逆的に制御する実験を行った。その結果、モニタで観察される光応答性表面上の任意の位置で、光応答性表面の着色状態を分解能30μmの精度をもって、5秒程度のタイムスケールで可逆的に変化させられることを確認した。

#### 【0018】

【発明の効果】本発明によって、従来技術では両立できなかった細胞の精密分離に加え、該分離において細胞にECMや膜タンパク質の機能を保持させることが可能となったことにより細胞の器官特異的機能の維持を同時に実現することが可能となった。したがって、足場依存性細胞の極めて有利な細胞の培養・分離回収システムが提供できた。また、表面特性の変化が可逆的であるような光応答性材料からなる細胞接着性表面を用いることで、光照射による脱着操作と他種細胞の播種を繰り返し行い、該表面上の培養細胞の種類、位置、配列を任意かつ高精度に操作することも可能となった。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の細胞の培養、分別方法の概略を示す工程図である。

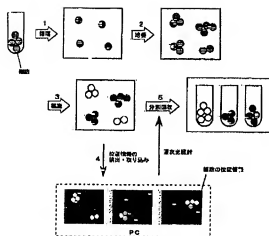
【図2】本発明において、複数種の細胞をその種類毎に分別回収する場合の工程概略図である。

【図3】本発明の培養、分別方法の応用例を示す概略図である。

【図4】本発明の細胞及び分別装置の1例を示す全体構成図である。

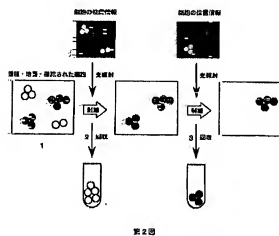
【図5】本発明の細胞及び分別装置における培養キュベットの細胞選択剥離の様態を示す要部図である。

【図1】



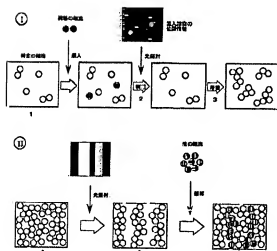
第1図

【図2】



第2図

【図3】



第3図





フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

(参考)

C 1 2 N 1/02

C 1 2 N 5/00

E

(72)発明者 新保 外志夫

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法

人産業技術総合研究所つくばセンター内

Fターム(参考) 4B029 AA08 AA21 BB11 CC02 CC08

GA02 GA08 GB09

4B065 AA90X AC20 BA30 BC45

BC48 BC50 CA60